

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, G01N 33/577 // C12N 5/20, 15/06 (C12P 21/08 C12R 1/91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 91/12333 (43) 国際公開日 1991年8月22日 (22. 08. 1991)
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00144 (22) 国際出願日 1991年2月4日 (04. 02. 91) (30) 優先権データ 特願平 2/28098 1990年2月7日 (07. 02. 90) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘紡株式会社 (KANEBO, LTD.) [JP/JP] 〒131 東京都墨田区墨田五丁目17番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大本弘志 (OOMOTO, Hiroshi) [JP/JP] 〒534 大阪府大阪市都島区友成町1丁目6番8-502号 Osaka, (JP) 井上神太郎 (INOUE, Shintaro) [JP/JP] 〒250 神奈川県小田原市寿町4丁目20番1号 Kanagawa, (JP) 岩本成一 (IWAMOTO, Seiichi) [JP/JP] 〒651-22 兵庫県神戸市西区狩場台1丁目14番地の1 Hyogo, (JP) (74) 代理人 弁理士 赤岡通夫 (AKAOKA, Michio) 〒541 大阪府大阪市中央区炭路町2丁目1番13号 弘栄ビル Osaka, (JP)		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ANTIPROCOLLAGENASE MONOCLONAL ANTIBODY AND ASSAY OF PROCOLLAGENASE THERE- WITH (54) 発明の名称 抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体、およびそれを用いるプロコラゲナーゼの定量方法 (57) Abstract A monoclonal antibody against a procollagenase with a molecular weight of 52,000 for a collagenase which hydrolyzes col- lagens of types I, II and III, characterized in that: (a) it belongs to the immunoglobulin class and the subclass G <sub>1</sub> and the L chain isotype belongs to κ, and (b) it has an activity of inhibiting the collagenase which hydrolyzes collagens of types I, II and III; and a method of enzyme immunoassay of procollagenase.		

(57) 要約

I 型、II 型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼの分子量52000 のプロコラゲナーゼに対するモノクローナル抗体であつて、

(a) イムノグロブリンクラスおよびサブクラスG<sub>1</sub>に属し、L鎖アイソタイプがκに属する、

(b) I 型、II 型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼに対し阻害活性を有する、

ことを特徴とするモノクローナル抗体およびこれを用いて、酵素免疫測定法によってプロコラゲナーゼを定量する方法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャド
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トogo
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

## 明 細 書

抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体、およびそれを用いるプロコラゲナーゼの定量方法

### 技術分野

本発明はⅠ型、Ⅱ型およびⅢ型コラーゲンを分解するコラゲナーゼのプロコラゲナーゼに対する新規モノクローナル抗体、およびそれを用いる酵素免疫測定法によるプロコラゲナーゼの定量方法に関する。

### 背景技術

コラゲナーゼはコラーゲンを分解する酵素であり、生体に広く分布している。

慢性関節リウマチ滑膜、潰瘍角膜、あるいは骨腫瘍組織等の病態組織ではコラゲナーゼ活性が高値を示すことから、病態組織、体液中のコラゲナーゼ活性を測定することはこれら疾患を診断するうえで有益である。

コラゲナーゼは潜在（不活性）型のプロコラゲナーゼとして産生され、組織中ではコラゲナーゼとプロコラゲナーゼの両方が存在しており、従ってコラゲナーゼ活性を測定する場合には、トリプシン等の蛋白分解酵素あるいは水銀化合物等による前処理によってプロコラゲナーゼを活性化

することが必要であるとともに、また、組織中には多量のコラゲナーゼ活性阻害物質が存在するため、このコラゲナーゼ活性阻害物質を除去するための非常に煩雑な操作も行う必要がある。

コラゲナーゼは基質となるコラーゲンによって数種類のコラゲナーゼが知られており、Ⅰ型、Ⅱ型およびⅢ型コラーゲン（これらを間質型コラーゲンと言う）を分解するコラゲナーゼ（以下、間質型コラゲナーゼと言う）と、Ⅳ型コラーゲンおよびⅤ型コラーゲンを分解するコラゲナーゼ等に分類される。

間質型コラゲナーゼのプロコラゲナーゼ（以下、間質型プロコラゲナーゼと言う）に対するモノクローナル抗体としては、分子量52000 と分子量57000 の間質型プロコラゲナーゼの混合物を抗原に用いて調製された11種のモノクローナル抗体が開示されているが（Biochemistry、27巻、6751頁、1988年参照）、イムノグロブリンクラスおよびサブクラスG<sub>1</sub>に属し、L鎖のアイソタイプがκであってコラゲナーゼ阻害活性を有する本発明のモノクローナル抗体は開示されていない。

#### 発明の開示

本発明者等は、分子量52000 の間質型プロコラゲナーゼ

に対する新規モノクローナル抗体を調製し、これを用いる酵素免疫測定法による簡便なプロコラゲナーゼの定量方法確立し、この方法を用いてヒト血清中のプロコラゲナーゼ濃度を定量したところ、癌患者、慢性関節リウマチ（以下、RAと略記する）患者、変形性関節症（以下、OAと略記する）患者の血清中プロコラゲナーゼ濃度が健常者よりも有意に高いことを見出して、本発明を完成させた。

本発明の目的は間質型プロコラゲナーゼに対する新規モノクローナル抗体を提供することにある。本発明の他の目的は新規モノクローナル抗体を用いる酵素免疫測定法によるプロコラゲナーゼの簡便な定量方法を提供することにある。

本発明の定量方法を用いて、ヒト血清中プロコラゲナーゼ濃度の定量を行うことは、コラゲナーゼ活性が亢進する疾患を有する患者、例えば、癌、RA、OA等の患者の診断をするうえで極めて有益である。

以下、本発明のモノクローナル抗体の調製方法およびこれを用いる酵素免疫測定法によるプロコラゲナーゼの定量方法について説明する。

まず、本発明のモノクローナル抗体の調製方法について説明する。

本発明のモノクローナル抗体は以下の(1)～(6)の工程で得ることができる。

(1) 分子量52000の間質型プロコラゲナーゼ(抗原)の調製

本発明のモノクローナル抗体の調製に用いる分子量52000の間質型プロコラゲナーゼは、ヒト線維肉腫細胞HT1080(ATCC CCL 121)由来であって無血清無蛋白質培地で生育可能な細胞であるHT1080-SF2株(生体の科学、37巻、4号、271頁、1986年参照)、あるいはこれと同様にヒト線維肉腫細胞HT1080(ATCC CCL 121)を無血清無蛋白質培地で長期培養して得られる無血清無蛋白質培地で生育可能な細胞「ヒト線維肉腫HT-P12-4、工業技術院微生物工業技術研究所受託番号、FERM P-10912」を培養し、その培養上清から分離精製することによって調製することができる。

上記細胞の培養は、イーグルアミノ酸ビタミン培地を含むハム-F12培地中、35～37℃で4日間以上、好ましくは7～14日間静置することにより行う。

プロコラゲナーゼの分離精製は、培養上清を、陽イオン交換樹脂、例えば、CM-セファロースCL-6B™(ファルマシア社製)を用いたカラムクロマトグラフィー、次いで、亜鉛キレーティングセファロース6B™(ファルマシア社製)



を用いたカラムクロマトグラフィーで行う。

前者のカラムクロマトグラフィーの展開液には、 $\text{CaCl}_2$  および非イオン界面活性剤を含むトリス塩酸緩衝液と、 $\text{CaCl}_2$ 、非イオン界面活性剤および $\text{NaCl}$ を含むトリス塩酸緩衝液(pH7.8) とを用い、直線的な $\text{NaCl}$ の濃度勾配をかけてプロコラゲナーゼを溶出させる。

後者のカラムクロマトグラフィーの展開液には、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$  および非イオン界面活性剤、たとえばポリオキシエチレン ラウリルエーテルを含む酢酸緩衝液(pH4.8) と、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$  および非イオン界面活性剤を含む2-(モルホリノ) エタンスルホン酸モノハイドレート緩衝液(pH 約6.8) とを用い、pH勾配をかけながら(pHを徐々に低下させながら) カラムを展開する。

## (2) 抗体産生脾細胞の調製

上記で得たプロコラゲナーゼと、例えば、フロイント アジュバント等のアジュバントよりなるエマルジョンを、マウス、例えばBALB/cマウス、好ましくは6週齢以上のBALB/cマウスに投与して免疫し、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製する。

免疫は抗原としてのプロコラゲナーゼを通常3回以上投与することにより行う。1回当たりの投与量は、1 ~ 1000

$\mu\text{g}$ /マウスであり、通常、 $20\sim 1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の溶液とし、これと例えば、フロイントアジュバント等のアジュバントとを等量混合して投与する。

免疫の後、マウスの脾臓を摘出し、ダルベッコ氏変法イーグル氏最少必須培地（以下、DMEM培地と略記する）にその細胞を分散させて抗体産生脾細胞の懸濁液を得る。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性の骨髓腫細胞、例えば、市販のマウス由来骨髓腫細胞P3X63Ag8U.1（以下、P3U1と略記する）、Sp2/0-Ag14、P3X63-Ag8.653（何れも大日本製薬により販売されている）等の骨髓腫細胞を用いる。

これら骨髓腫細胞は、約 $100\mu\text{M}$  8-アザグアニンを含む培地、例えば、ウシ胎仔血清を $5\sim 20\text{v}/\text{v}\%$ 補充したRPMI 1640 培地またはウシ胎仔血清を $5\sim 20\text{v}/\text{v}\%$ 補充したDMEM 培地中、 $5\sim 10\text{v}/\text{v}\%$   $\text{CO}_2$ 含有空気雰囲気下に $37^\circ\text{C}$ で培養した後、8-アザグアニンを含まない培地で洗浄し、以下の細胞融合に用いる。

### (4) 細胞融合および抗プロコラゲナーゼ抗体産生ハイブリドーマ群の選別

上記抗体産生脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合処理し、このなかから抗プロコラゲナーゼ抗体を産生するハイブリ

ドーマ群を選別する。

細胞融合処理は、抗体産生脾細胞懸濁液と骨髓腫細胞懸濁液とを混合し、例えば、Nature, 266 巻, 550頁, 1977年に記載の方法に準じ、低速遠心によって上清を除き両細胞の混合物を得て、これにポリエチレングリコール（以下、PEG と略記する）溶液を加え、攪拌、振盪するか、あるいはSomatic Cell Genetics, 3 巻, 231 頁, 1977年に記載の方法に準じて、抗体産生脾細胞と骨髓腫細胞とをPEG 溶液と混和し、低速遠心することにより行う。

PEG の平均分子量は、1000～6000が好ましく、DMEM培地との混合溶液として30～50w/v%の濃度で用いるのが好ましい。

抗体産生脾細胞と骨髓腫細胞の混合比は、骨髓腫細胞に対し、抗体産生脾細胞を1～20倍用いるのが好ましい。

次に上記で融合処理した細胞混合物を、ハイブリドーマだけが生育可能な培地、例えば、HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地）に約 $1 \times 10^6$  個/mlの割合で懸濁し、これをマイクロプレートのウェル中に分注して5～10v/v% CO<sub>2</sub>含有空気雰囲気下に37℃で、通常4日目に培地交換し、10～14日間培養する。

次に、細胞が生育したウェルの培養上清をプロコラゲナ

ーゼを固相化抗原とし、酵素標識第2抗体を用いた酵素免疫測定法により測定し、抗プロコラゲナーゼ抗体が産生されたウエルを選別する。

(5) ハイブリドーマのクローニングおよび選別

上記で選別したウエル中のハイブリドーマ群を例えば HAT 培地を用いた限界希釈法 (HYBRIDOMA TECHNIQUES EMBO Course 1980, Basel 参照) 等によりクローニングし、培養上清を前記と同様酵素免疫測定法で試験して抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体を産生している単一のクローンを含むウエルを選択することにより、クローニングされた抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得る。

(6) モノクローナル抗体の製造および選別

次いで、このハイブリドーマを培養し、培養液からモノクローナル抗体を分離精製するか、あるいはハイブリドーマを動物の腹腔内に移植し増殖させて、腹水からモノクローナル抗体を分離精製し、モノクローナル抗体の免疫学的な分類試験、および間質型コラゲナーゼに対する阻害活性を測定し、本発明のモノクローナル抗体およびそれを産生するハイブリドーマを選別する。

ハイブリドーマの培養は、通常の培地、例えば、ウシ胎

仔血清を5～20v/v%補充したRPMI 1640 培地またはウシ胎仔血清を5～20v/v%補充したDMEM培地を用い、通常3日～3週間、好ましくは約3日毎に上記培地に植え継ぎながら10～14日間培養する。

動物腹腔内でのハイブリドーマの増殖は、ハイブリドーマと適合性のある哺乳動物、例えば、BALB/cマウス等のマウスの腹腔にハイブリドーマを移植し、1～2週間動物を飼育することにより行う。

モノクローナル抗体の精製は、上記の培養液あるいは腹水を遠心分離し、得られる上清を例えば、硫酸塩析により、あるいはイオン交換クロマトグラフィーにより行う。

硫酸塩析は、30～50% 飽和硫酸を用いるのが好ましい。塩析したモノクローナル抗体は、pH7.4 のリン酸緩衝化生理食塩液（以下、PBS と略記する）に対して透析する。

イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換樹脂、例えば、DEAEセファロース™（ファルマシア社製）を用いたカラムクロマトグラフィーで行うのが好ましい。溶出溶媒には通常、pH約7.0 のトリス緩衝液を用い、モノクローナル抗体の溶液を得る。

モノクローナル抗体の免疫学的な分類試験は抗マウスイムノグロブリン抗体を固相化抗体とする酵素免疫測定法に

より行い、抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体のクラス、サブクラスおよびL鎖のアイソタイプを決定する。

間質型コラゲナーゼに対するモノクローナル抗体の阻害活性の測定は、抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体と既知量のコラゲナーゼ溶液とを混合し、35℃で10分間反応させた後、炎症、4巻、123頁、1984年に記載の方法（以下、永井等の方法と言う）によりコラゲナーゼの活性を測定することにより行う。そして、コラゲナーゼ活性を50%抑制するのに必要なモノクローナル抗体溶液の濃度（IC<sub>50</sub>）を求める。

このようにして、下記11種類の新規抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体（以下それぞれ、K5E1, K2F7, K1C2, K1F12, K2C3, K3B2, K3F10, K4B4, K4F5, K4H11 およびK5G5と呼ぶ）およびこれらモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。

これらモノクローナル抗体のクラス、サブクラス、L鎖のアイソタイプおよびコラゲナーゼ阻害活性（IC<sub>50</sub>）は第1表の通りである。

（以下余白）

第 1 表

モノクローナル 抗体	イムノグロブリン クラスおよび サブクラス/ L鎖アイソタイプ	IC <sub>50</sub> (ng/ml)
K5E1	G <sub>1</sub> /κ	2.5
K2F7	G <sub>1</sub> /κ	2.7
K1C2	G <sub>1</sub> /κ	830
K1F12	G <sub>1</sub> /κ	10.6
K2C3	G <sub>1</sub> /κ	5.4
K3B2	G <sub>1</sub> /κ	1.9
K3F10	G <sub>1</sub> /κ	25.0
K4B4	G <sub>1</sub> /κ	59.5
K4F5	G <sub>1</sub> /κ	5.2
K4H11	G <sub>1</sub> /κ	4.3
K5G5	G <sub>1</sub> /κ	3.6

K5E1を産生するハイブリドーマは「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K5E1) 産生ハイブリドーマ」と表示して、K2F7を産生するハイブリドーマは「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K2F7) 産生ハイブリドーマ」と表示してそれぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K5E1) 産生ハイブリドーマ」の受託番号はFERM BP-2701であり、「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K2F7) 産生ハイブリドーマ」の受託番号はFERM BP-2700である。

次に、本発明によるプロコラゲナーゼの定量方法について説明する。

本発明によるプロコラゲナーゼの定量方法は、上記のようにして得られる本発明のモノクローナル抗体を用いて酵素免疫測定法によりヒトの体液、特に血清中のプロコラゲナーゼ濃度を定量することによって行われる。

酵素免疫測定法は常法に従って行うことができるが、サンドイッチ法により行うことが好ましい。

以下、サンドイッチ法による本発明のプロコラゲナーゼの定量方法について説明する。

サンドイッチ法の固相化抗体は、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレンまたはポリ塩化ビニル製の、マイクロプレート、ビーズ、スティックまたは試験管等の担体に本発明モノクローナル抗体を吸着法あるいは架橋法等の常法により固定化して調製される。

サンドイッチ法に使用する酵素標識抗体は、本発明のモノクローナル抗体を例えば、ビオチン、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素と、公知のマレイミド化合物、ピリジル・ジスルフィド化合物等の架橋試薬を用いて公知の方法で調製される。例えば、ビオチン標識抗体は、Journal of



Clinical Microbiology, 20巻、109頁、1984年に記載の方法に準じて調製することができる。西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗体は、W. Knapp等編集、immunofluorescence and related staining technics, Elsevier, Amsterdam, 1978年出版、215頁に記載の方法に準じて調製することができる。

固相化抗体と標識抗体には互いに異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体の組合せであって、かつ感度良くプロコラゲナーゼが測定可能な組合せを使用するのが好ましい。好ましいモノクローナル抗体の組み合わせは以下の方法により選ぶことができる。

異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体の組合せは、固相化したプロコラゲナーゼに、ビオチンで標識した抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体（標識方法は Journal of Clinical Microbiology, 20巻、109 頁、1984年に記載の方法に準じる）とこれに対して20倍量の抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体とを反応させ、競合的酵素免疫測定法により互いに競合しないモノクローナル抗体を選択することにより決定することができる。

感度良くプロコラゲナーゼが測定可能なモノクローナル抗体の組合せは、上記で選択したモノクローナル抗体をそれぞれ固相化抗体あるいは標識抗体として使用し、サンド

イッチ法により既知量のプロコラゲナーゼを測定し、検量線を求めて測定感度を検討することにより選択することができる。

また、本発明のモノクローナル抗体のうち、固相化抗体としては前記コラゲナーゼ阻害活性 ( $IC_{50}$ ) が 10ng/ml 未満であるものが好適に使用される。

本発明のモノクローナル抗体の好ましい具体的な組合せ〔(固相化抗体に使用する抗体、標識抗体として使用する抗体)として表示する〕としては、(K5E1, K2F7)、(K4H11, K2F7)、(K4H11, K3B2)、(K4H11, K3F10)、(K4H11, K4B4)、(K4F5, K4H11)、(K4F5, K3F10)、(K5G5, K4H11)、(K5G5, K1C2)、(K5G5, K1F12)、(K2F7, K1F12)、(K2F7, K3F10)、(K2F7, K4H11)、(K5E1, K4B4) および (K5E1, K4F5) 等を挙げることができ、特に、固相化抗体に K5E1 を、標識抗体に K2F7 を用いるとプロコラゲナーゼを感度良く測定できるので好ましい。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

なお、実施例中モノクローナル抗体のクラス、サブクラスおよび鎖アイソタイプの決定、およびモノクローナル抗体のコラゲナーゼ阻害活性測定は以下の方法により行った。

モノクローナル抗体のクラス、サブクラスおよび鎖アイソタイプ  
の決定方法：

マウスイムノグロブリンの各クラスおよびサブクラス (IgA, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>およびIgG<sub>3</sub>) に対する抗体および鎖 (κおよびλ) に対する抗体 (全てマイルス社製) をそれぞれ0.05M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH9.6) で5 μg/mlの濃度に調製し、それぞれ96ウエルのマイクロプレート (イムロン600) の各ウエルに100 μl ずつ分注し、4℃で一晩静置し、マイクロプレートのウエルに固定化した。

各ウエルをPBS (pH7.4) にTween-20 (ポリオキシエチレンソルビタン モノラウレイト) を0.05v/v%含有する洗浄液 (以下、T-PBS と略記する) で洗浄した後、ウシ血清アルブミン (以下、BSA と略記する、和光純薬製) を0.5 w/v%含有するPBS (pH7.4) 300 μl を加えて室温で1時間静置しその上清を除去した。

次に、BSA を0.1w/v% 含有するPBS (pH7.4) でモノクローナル抗体を1 μg/mlの濃度に希釈し、この100 μl を各ウエルに加えて室温で2時間反応させ、T-PBS (pH7.4) で洗浄した。

次に、ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン (ザイメ

ット社製)を、BSA を0.1w/v% 含有するPBS(pH7.4)で5  $\mu$ g/mlの濃度に調製し、この溶液100  $\mu$ l ずつを各ウエルに加え室温で1時間反応させ、T-PBS(pH7.4)で洗浄した。

次に、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(アマーシヤム社製)を、BSA を0.1w/v% 含有するPBS(pH7.4)で1000倍に希釈し、この100  $\mu$ l ずつを各ウエルに加え、室温で30分間反応させ、T-PBS で洗浄した。

次に、過酸化水素とo-フェニレンジアミンとを含有する(前者の濃度0.015w/v%、後者の濃度0.2mg/ml) 0.15 M クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を各ウエルに100  $\mu$ l ずつ加え、室温で5分間反応させた後、5N硫酸を各ウエルに50  $\mu$ l ずつ加えて反応を停止させた。

得られた溶液の492nm における吸光度をコロナ2波長マイクロプレート光度計(MTP-22、コロナ電気社製)を用いて測定し、その吸光度からマウスイムノグロブリンの各クラスおよびサブクラス(IgA, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>,またはIgG<sub>3</sub>)に対する抗体、およびL鎖( $\kappa$ または $\lambda$ )に対する抗体に対するモノクローナル抗体の反応性を判定し、モノクローナル抗体のクラス、サブクラスおよびL鎖のアイソタイプを決定した。

モノクローナル抗体のコラゲナーゼ阻害活性測定方法:

標準コラゲナーゼ溶液50 $\mu$ l(0.7 単位/ml)に、測定用緩衝液(0.2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 v/v% Brij-35および0.02w/v% NaN<sub>3</sub>を含有する50mMトリス塩酸緩衝液、pH7.5)で希釈した抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体溶液50 $\mu$ lを35℃で混合した。10分後、この混合液に基質としてフルオレッセインソチオシアネートで標識されたウシ由来I型コラーゲン溶液[FITC-コラーゲン、コスモバイオ社製の0.01N 酢酸溶液を、0.4M NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>および0.04w/v% NaN<sub>3</sub>を含有する100mM トリス塩酸塩緩衝液(pH 7.5)で2倍に希釈して調製、濃度0.5mg/ml] 100 $\mu$ lを加え、永井等の方法に従って混合液中のコラゲナーゼ活性を測定した。各種濃度の抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体溶液について試験し、抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体の用量とコラゲナーゼ活性の回帰直線から、標準コラゲナーゼ溶液の活性を50% 阻害する抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体の濃度[IC<sub>50</sub>(ng/ml)]を求めた。

なお、上記標準コラゲナーゼ溶液とは、後記実施例1-(1)のプロコラゲナーゼ溶液を永井等の方法でトリプシン(シグマ社製、type12)により活性化した後、ダイズトリプシンインヒビター(メルク社製)でトリプシンを失活させ、永井等の方法に従ってコラゲナーゼ活性を測定し、

測定用緩衝液にて0.7 単位/ml に調製したものである。

#### 実施例 1

##### モノクローナル抗体の製造：

以下の(1) ～ (6) により本発明モノクローナル抗体を得た。

##### (1) 分子量52000 の間質型プロコラゲナーゼ（抗原）の調製

ヒト線維肉腫細胞HT1080由来で無血清無蛋白質培地に於いて生育可能な足場非依存性細胞（「ヒト線維肉腫HT-P12-4」工業技術院微生物工業技術研究所受託番号、FERM P-10912） $1.8 \times 10^8$  個を、イーグルアミノ酸ビタミン粉末培地（日水製薬社製）1.76g/l を含むハム-F12培地180ml で懸濁し、その60mlずつを37℃で14日間静置培養して、その培養上清を得、-80℃で保存した。

上記で得られた培養上清液計160ml を1mM  $\text{CaCl}_2$  および0.05v/v% Brij-35を含む10mMトリス塩酸緩衝液（4℃でpH 7.8 に調整、以下、CM-A緩衝液と略記する）で総量400ml にメスアップし、CM-A緩衝液で平衡化したCM- セファロー スCL-6B™（ファルマシア社製）充填カラム（2.46cm×18 cm、充填容量85ml）に供した。同緩衝液で充分カラムを洗浄後、CM-A緩衝液および0.7M NaClを含むCM-A緩衝液各

250ml を用い、毎時40mlの流速で直線的なNaCl勾配をかけプロコラゲナーゼを含有する画分 (NaCl濃度、0.3~0.5M) を得た。本画分をYM-5膜 (アミコン社製) を用いて約8倍に濃縮して粗製プロコラゲナーゼ溶液 (濃度約 600  $\mu$ g/ml) を得た。この溶液を0.5M NaCl, 1mM  $\text{CaCl}_2$  および0.05 v/v% Brij-35を含む 50mM 2-(モルホリノ) エタンスルホン酸モノハイドレート緩衝液 (トリスにて4℃でpH6.8 に調整、以下、MES-A 緩衝液と略記する) で充分平衡化した亜鉛キレーティングセファロース6B™ (ファルマシア社製) 充填カラム (1.2cm  $\times$  16cm、充填容量18ml) に供した。MES-A 緩衝液で充分洗浄した後、MES-A 緩衝液45ml と、0.5M NaCl, 1mM  $\text{CaCl}_2$  および0.05v/v% Brij-35 を含む酢酸緩衝液 (トリスにて4℃でpH4.8 に調整、以下、酢酸緩衝液と略記する) 45mlとを用い、毎時13mlの流速でpH勾配をかけながらカラムを展開した。プロコラゲナーゼ画分は展開液のpHが約5.3 付近に達した時に極めてシャープなピークとして溶出された。この画分を集め、プロコラゲナーゼ溶液約6ml (濃度約300  $\mu$ g/ml) を得た。これをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べると分子量52000 の単一バンドを示した。

## (2) 抗体産生脾細胞の調製

上記(1)の粗製プロコラゲナーゼ溶液133  $\mu$ l (約68  $\mu$ gのプロコラゲナーゼを含有する)を等容量の完全フロイントアジュバント(ディフコ社製)と混合してエマルジョンを調製し、このエマルジョン約250  $\mu$ lをBALB/cマウス(9週齢)の皮下に、約10 $\mu$ lを足蹠にそれぞれ投与して、初回免疫を行った。その14日目および36日目に、同様にして粗製プロコラゲナーゼ溶液と不完全フロイントアジュバント(ディフコ社製)よりなるエマルジョンを投与して、追加免疫を2回行った。さらに、2回目の追加免疫の14日目に上記のプロコラゲナーゼ溶液約10 $\mu$ gを含む生理食塩水溶液200  $\mu$ lを静脈内投与して最終免疫した。その3日後にマウスを屠殺し、無菌的に脾臓を摘出した。摘出脾臓をDMEM培地中にてハサミで細切した後、メッシュを通して単細胞懸濁液とし、DMEM培地で3回洗浄し、抗体産生脾細胞のDMEM培地懸濁液10ml ( $9.3 \times 10^7$  個の細胞を含有)を調製した。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

マウス骨髓腫細胞P3U1(ATCC CRL-1597、 $5 \times 10^6$  個)を、8-アザグアニンを100  $\mu$ M およびウシ胎仔血清を10 v/v%含む下記RPMI 1640 培地25mlに加え、5v/v% CO<sub>2</sub> 含有空気雰囲気下、37℃で5日間培養し、上記脾細胞と同様に



DMEM培地で2回洗浄し、マウス骨髓腫細胞P3U1のDMEM培地懸濁液10ml ( $1.0 \times 10^6$  個の細胞を含有) を調製した。

RPMI 1640 培地の調製法:

RPMI 1640(ギブコ社製) 10.4g、炭酸水素ナトリウム 1.3g、L-グルタミン25.2mg、ペニシリンG 63.5mg、硫酸ストレプトマイシン100mg、タイロシン10mgおよび2-メルカプトエタノール溶液(和光純薬社製) 40 $\mu$ l に蒸留水を加えて1000mlにメスアップし、0.45 $\mu$ m メンブランフィルター(東洋濾紙社製)で除菌濾過して調製した。

(4) 細胞融合および抗プロコラゲナーゼ抗体産生ハイブリドーマ群の選別

上記(2) および(3) で得た抗体産生脾細胞の懸濁液10ml (細胞数:  $9.3 \times 10^7$  個) とマウス骨髓腫細胞P3U1の懸濁液0.93ml (細胞数:  $9.3 \times 10^6$  個) とを50mlの遠心管中で混合し、1000rpm で10分間遠心分離し、両細胞の混合物を沈澱させた。上清を除去した後、両細胞混合物にポリエチレングリコール1000およびジメチルスルホキシド(以下、DMSOと略記する)を含有するDMEM培地(それぞれの含有率、42.5w/v%および15v/v%) 0.5ml を穏やかに攪拌しながら1分間で滴下した。

次に、DMEM培地1ml、1ml、5ml、5ml および10mlを順次穏や

かに攪拌しながら1分間ずつかけて滴下することにより細胞融合処理を行った。

次いで、1000rpmで10分間遠心分離して上清を除去し、融合処理細胞の混合物を得た。

この混合物を、HAT 培地（100  $\mu$ M ヒボキサンチン、0.4  $\mu$ M アミノプテリンおよび16 $\mu$ M チミジンとウシ胎仔血清を10v/v%含むRPMI 1640 培地）に懸濁し、脾細胞数が約 $10^6$  個/mlの細胞浮遊液93mlを得た。

次いで、上記細胞浮遊液を96ウエルのマイクロプレート（ファルコン3072、ファルコン社製）に0.2ml/ウエルの割合で播き込み、5v/v% CO<sub>2</sub> 含有空気の雰囲気下に37℃で培養した。ハイブリドーマを充分生育させるために、培養4日目に各ウエルの培養上清全量を新しいHAT 培地（0.2ml/ウエル）と交換して合計10日間培養した。

次いで、以下に述べる方法により各ウエルの培養上清（以下、これを培養上清Aと呼ぶ）を、プロコラゲナーゼを固相化抗原とし、酵素標識第2抗体を用いる固相法により調べ、抗プロコラゲナーゼ抗体を産生しているウエルを選別し、抗プロコラゲナーゼ抗体を産生するハイブリドーマ群を選別した。

酵素標識第2抗体を用いる固相法による抗プロコラゲナー

ゼ抗体産生ハイブリドーマ群の選別方法：

前記(1) で得られた精製プロコラゲナーゼを、0.05M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6) で1  $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製し、100  $\mu\text{l}$  ずつを96ウエルのマイクロプレート(イムロン600、グライナー社製)の各ウエルに分注し、4℃で一晩静置し、プロコラゲナーゼをウエルに固定化した。各ウエルを、T-PBS で洗浄した後、BSA を0.5 w/v%含むPBS(pH7.4)300  $\mu\text{l}$  を加えて、室温で1時間静置し、その上清を除去した。次に、BSA を0.1 w/v%含むPBS(pH7.4)で前記の各培養上清Aを2倍に希釈し、この100  $\mu\text{l}$  を加えて室温で2時間反応させ、T-PBS(pH7.4)で洗浄した。

次に、ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン(ザイメット社製)を、BSA を0.1 w/v%含むPBS(pH7.4)で5  $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製し、この溶液100  $\mu\text{l}$  ずつを各ウエルに加え、室温で1時間反応させ、T-PBS(pH7.4)で洗浄した。

次に、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(アマーシャム社製)を、BSA を0.1 w/v%含むPBS(pH7.4)で1000倍に希釈し、この100  $\mu\text{l}$  ずつを各ウエルに加え、室温で30分間反応させ、T-PBS(pH7.4)で洗浄した。

次に、過酸化水素とo-フェニレンジアミンとを含有する

(前者の濃度0.015w/v%、後者の濃度0.2mg/ml) 0.15M クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を、各ウエルに 100  $\mu$ l ずつ加え、室温で5分間反応させた。

次いで、5N硫酸を各ウエルに50 $\mu$ l ずつ加えて反応を停止させた(得られた溶液を試験液Tと呼ぶ)。

一方、培養上清AのかわりにHAT 培地を加える以外は上記と同様の操作をして対照液Cを得た。

試験液Tおよび対照液Cの492nm における吸光度を、コロナ2波長マイクロプレート光度計 (MTP-22、コロナ電気社製) を用いて、それぞれ測定した。そして、対照液Cの吸光度よりも0.1 以上高い吸光度を示す試験液Tが得られたウエル21個を選別した。

#### (5) ハイブリドーマのクローニングおよび選別

上記のウエル中のハイブリドーマ群を限界希釈法によりクローニングした。

即ち、HAT 培地に、上記(4) で選択したウエル中のハイブリドーマ群とBALB/cマウス胸腺細胞(常法により6週齢のBALB/cマウスより得た)とをHAT 培地に懸濁し、ハイブリドーマの濃度が3個/ml、胸腺細胞の濃度が約  $3 \times 10^6$  個/mlの混合細胞懸濁液を調製した。この懸濁液の0.2ml ずつを、96ウエルのマイクロプレート (ファルコン3072)

の各ウェルに分注し、5v/v% CO<sub>2</sub> 含有空気の雰囲気下に37℃で14日間培養した。1ウェル当たり1コロニーを形成し、細胞増殖の良好なウェルの培養上清について、前記(4)に記載の酵素標識第2抗体を用いる固相法と同様の操作により492nmにおける吸光度を測定し、吸光度(A<sub>492</sub>)が0.3以上のウェルを選択し、抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ14クローンを得た。この時の吸光度を第2表に示す。

得られた14クローンのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をそれぞれ、K2F7、K5E1、K1C2、K1E6、K1F12、K2C3、K3B2、K3F10、K4B4、K4F5、K4H11、K5D1、K5G5、K1D8と呼ぶ。

(以下余白)

第 2 表

モノクローナル抗体	反 応 性 (吸光度 $A_{492}$ )
K 2 F 7	0. 4 1 7
K 5 E 1	0. 8 3 9
K 1 C 2	1. 0 9 7
K 1 E 6	0. 4 0 1
K 1 F 1 2	1. 3 5 5
K 2 C 3	0. 4 0 2
K 3 B 2	0. 6 3 8
K 3 F 1 0	0. 6 4 3
K 4 B 4	0. 3 1 2
K 4 F 5	0. 5 5 9
K 4 H 1 1	1. 3 9 5
K 5 D 1	0. 3 7 7
K 5 G 5	0. 5 8 7
K 1 D 8	0. 5 5 2

HAT 培地中の上記の各ハイブリドーマの $10^5$ 個ずつをそれぞれHT培地（100  $\mu$ M ヒボキサントンおよび16 $\mu$ M チミジンとウシ胎仔血清を10v/v%含むRPMI 1640 培地）5ml に移して、5 v/v%  $CO_2$ 含有空気の雰囲気下に37℃で14日間培養し、次いで、それぞれをウシ胎仔血清を10v/v%含むRPMI

1640 培地100ml に移して、5v/v% CO<sub>2</sub> 含有空気の雰囲気  
下に37℃で14日間培養した。

(6) モノクローナル抗体の製造および選別

BALB/cマウス(9週齢)の腹腔内にプリスタン(2,6,10,14  
- テトラメチルペンタデカン) 0.5ml ずつを投与した。

その3週間目に、上記のハイブリドーマ14クローンをそ  
れぞれウシ胎仔血清を10v/v%含むRPMI 1640 培地に懸濁し  
(濃度、約  $2 \times 10^7$  個/ml)、この0.5ml をそれぞれマウ  
ス腹腔内に投与した。

その後、貯留した各腹水約10mlをそれぞれ採取し、遠心  
(1000rpm、10分間)して細胞成分を沈殿させ腹水上清液を  
得た。これに対して $\frac{1}{2}$ 容量の飽和硫酸アンモニウム水をそ  
れぞれ加え、室温で1時間攪拌した後、同温で1時間静置  
し、4℃、10000rpmで20分間遠心し、上清を捨てて沈殿を  
得た。

この沈殿にそれぞれ上記の各腹水上清液と同量の0.9w/v  
% 食塩水を加えて溶解し、4℃、10000 rpm で20分間遠心  
し、上清を得た。次に、この上清にそれぞれ前記腹水上清  
液の $\frac{1}{2}$ 容量の飽和硫酸アンモニウム水を加え、室温で1時  
間攪拌し、同温で1時間静置した後、4℃、10000rpmで20  
分間遠心し、上清を捨てて沈殿を得た。

次に、この沈殿をそれぞれ前記腹水上清液と等量のPBS (pH7.4) に溶解し、3000 ml のPBS (pH7.4) に対して、4℃で16時間透析して14種のモノクローナル抗体溶液を得た。

上記の各モノクローナル抗体のイムノグロブリンクラス、サブクラスおよびL鎖のアイソタイプを前記方法により決定し、また各モノクローナル抗体のコラゲナーゼ阻害活性を測定した。そしてイムノグロブリンクラスおよびサブクラスG<sub>1</sub>に属し、L鎖のアイソタイプがκに属し、かつコラゲナーゼ阻害活性を有するモノクローナル抗体を選択し、本発明のモノクローナル抗体11種を得た。

得られた本発明モノクローナル抗体11種の収量（抗体容量、その蛋白濃度）、イムノグロブリンクラス、サブクラス、L鎖のアイソタイプおよび50%コラゲナーゼ阻害活性（IC<sub>50</sub>）を第3表に示す。

なお、前記14種のモノクローナル抗体のうち2種のモノクローナル抗体（K1E6およびK5D1）はコラゲナーゼ阻害活性を示した（IC<sub>50</sub>はそれぞれ1470ng/ml, 27.8ng/ml）が、イムノグロブリンクラス、サブクラス、L鎖のアイソタイプは、それぞれM/κ、G<sub>2</sub>/κであった。一方、上記14種のモノクローナル抗体のうち1種のモノクローナル抗体（K1D8）はコラゲナーゼ阻害活性を示さず、イムノグロブ



リンクラス、サブクラス、L鎖のアイソタイプは、G<sub>1</sub> /  
κであった。

第 3 表

モノクロー ナル抗体	収 量		イムノグロブリン クラス および サ ブクラス / L鎖アイ ソタイプ	コラゲナーゼ 阻害活性 IC <sub>50</sub> (ng/ml)
	容量 (ml)	蛋白濃度 (mg/ml)		
K5E1	7.5	6.1	G <sub>1</sub> / κ	2.5
K2F7	7.9	6.1	G <sub>1</sub> / κ	2.7
K1C2	9.4	5.1	G <sub>1</sub> / κ	830
K1F12	7.1	8.5	G <sub>1</sub> / κ	10.6
K2C3	9.6	8.1	G <sub>1</sub> / κ	5.4
K3B2	12.2	7.0	G <sub>1</sub> / κ	1.9
K3F10	8.8	8.6	G <sub>1</sub> / κ	25.0
K4B4	8.3	9.7	G <sub>1</sub> / κ	59.5
K4F5	5.2	7.5	G <sub>1</sub> / κ	5.2
K4H11	7.7	4.2	G <sub>1</sub> / κ	4.3
K5G5	11.0	9.9	G <sub>1</sub> / κ	3.6

K5E1を産生するハイブリドーマは、「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K5E1) 産生ハイブリドーマ」と表示して、K2F7を産生するハイブリドーマは「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K2F7) 産生ハイブリドーマ」と表示してそれぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に

寄託した。「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K5 E1) 産生ハイブリドーマ」の受託番号はFERM BP-2701であり、「抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体 (K2F7) 産生ハイブリドーマ」の受託番号はFERM BP-2700である。

## 実施例 2

### 癌患者および健常人の血清中プロコラゲナーゼの定量：

#### (1) 固相化抗体の調製

実施例 1 で得た本発明の各モノクローナル抗体溶液を 0.05M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で 5  $\mu$ g/ml の濃度に調製し、その 100  $\mu$ l ずつを 96 ウェルのポリスチレン製マイクロプレート (イムロン 600) の各ウェルに分注し、4℃で一晩静置し、T-PBS (pH 7.4) で洗浄した。次いで、上記各ウェルに BSA を 0.5 w/v% 含有する PBS (pH 7.4) 300  $\mu$ l を加えて、室温で 1 時間静置し、その上清を除去して固相化抗体を得た。

#### (2) 標識抗体 (ビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体) の調製

Journal of Clinical Microbiology, 20 巻、109 頁、1984 年に記載の方法によりビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体を調製した。

即ち、まず、実施例 1 で得た本発明の各モノクローナル

抗体溶液をそれぞれ0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液で1mg/ml の濃度に希釈し、各1ml の溶液を得た。これを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液に対して室温で1時間透析しpH約8.5 の抗体溶液を調製した。

次に、上記抗体溶液1 mlに対して0.06mlのN-ヒドロキシサクシミド-ビオチン（PIERCE社製）のDMSO溶液（濃度1mg/ml）を加え、室温で4時間反応させた。反応液を1000 mlのPBS（pH7.4）に対して4℃で16時間透析し、約1ml（濃度約1 mg/ml）の各ビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体溶液を得た。

(3) 互いに異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体のグループ分け

実施例1-(1) のプロコラゲナーゼ溶液100  $\mu$ l を0.05 M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH9.6）で1  $\mu$ g/mlの濃度に調製し、その100  $\mu$ l ずつを96ウエルのマイクロプレート（イムロン600）の各ウエルに分注し、4℃で一晩静置した。各ウエルを、T-PBS（pH7.4）で洗浄した後、BSA を0.5 w/v%含有するPBS（pH 7.4）300  $\mu$ l を加えて、室温で1時間静置し、その上清を除去した。

次に、モノクローナル抗体希釈液〔実施例1のモノクローナル抗体溶液を、BSA を0.1 w/v%含有するPBS（pH7.4）で

希釈して調製、濃度 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ ] $50\text{ }\mu\text{l}$ と、ビオチン標識抗体の希釈液〔上記(2)のビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体を、BSAを $0.1\text{ w/v}\%$ 含有するPBS( $\text{pH}7.4$ )で希釈して調製、濃度 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ] $50\text{ }\mu\text{l}$ とを同時に各ウエルに加えて室温で2時間反応させ、T-PBS( $\text{pH}7.4$ )で洗浄した。

次に、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(アマーシャム社製)を、BSAを $0.1\text{ w/v}\%$ 含むPBS( $\text{pH}7.4$ )で1000倍に希釈し、この $100\text{ }\mu\text{l}$ ずつを各ウエルに加え、室温で30分間反応させ、T-PBS( $\text{pH}7.4$ )で洗浄した。

次に、過酸化水素とo-フェニレンジアミンとを含有する(前者の濃度 $0.015\text{ w/v}\%$ 、後者の濃度 $0.2\text{ mg/ml}$ ) $0.15\text{ M}$ クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液( $\text{pH}5.0$ )を、各ウエルに $100\text{ }\mu\text{l}$ ずつ加え、室温で5分間反応させた。

次いで、 $5\text{ N}$ 硫酸を各ウエルに $50\text{ }\mu\text{l}$ ずつ加えて反応を停止させ、 $492\text{ nm}$ における吸光度を、コロナ2波長マイクロプレート光度計(MTP-22、コロナ電気社製)を用いて、それぞれ測定した。そして、同一のモノクローナル抗体同士を反応させた時の(すなわち、モノクローナル抗体と、それと同一のモノクローナル抗体より調製した標識抗体とを反応させた時の)吸光度よりも $0.1$ 以上高い吸光度を示すモ

モノクローナル抗体同士の組合せは、互いに異なる抗原決定基を認識するものと判定した。

その結果、互いに異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体は以下の4グループに分けられた（各グループ内の抗体は共通の抗原決定基を認識する）。

第1グループ：K2C3, K2F7, K3B2, K4B4, K4F5, K5G5

第2グループ：K1C2, K4H11, K5E1

第3グループ：K1F12

第4グループ：K3F10

(4) サンドイッチ法によるプロコラゲナーゼ測定用検量線の作成と感度の良好な固相化抗体と標識抗体の組合せの決定

上記の異なるグループに属するモノクローナル抗体より調製した固相化抗体とビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチ法によるプロコラゲナーゼ測定用検量線を以下の方法により作成した。

まず、実施例 1.(1) で得たプロコラゲナーゼ溶液をBSAを0.1 w/v%含むPBS (pH7.4) で100 ng/ml から2倍階段希釈し、この100  $\mu$ l ずつを固相化抗体〔マイクロプレートのウェルに固定化された固相化抗体、前記(1)と同様にして調製した〕に加えて室温で2時間反応させ、T-PBS (pH7.4)

で洗浄した。

次に、各ビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体を、BSA を0.1 w/v%含有するPBS (pH7.4) で5  $\mu$ g/ml の濃度に調製し、この100  $\mu$ l ずつを固相化抗体の各ウエルに加え、室温で1時間反応させ、T-PBS (pH7.4) で洗浄した。

次に、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ (アマーシャム社製) を、BSA を0.1 w/v%含むPBS (pH7.4) で1000倍希釈し、この100  $\mu$ l ずつを各ウエルに加え、室温で30分間反応させ、T-PBS (pH7.4) で洗浄した。

次に、過酸化水素とo-フェニレンジアミンとを含有する (前者の濃度0.015 w/v%、後者の濃度0.2mg/ml) 0.15M クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を各ウエルに100  $\mu$ l ずつ加え、室温で5分間反応させた。

次に、5N硫酸を各ウエルに50  $\mu$ l ずつ加えて反応を停止させ、コロナ2波長マイクロプレート光度計 (MTP-22、コロナ電気社製) を用いて、反応液の492nm における吸光度を測定した。

そして、吸光度を縦軸に、プロコラゲナーゼ濃度を横軸とするプロコラゲナーゼ測定用の検量線を作成した。その結果、最も高感度にプロコラゲナーゼを測定可能なモノク

ローナル抗体の組み合わせの1つは、固相化モノクローナル抗体にK5E1を用い、ビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体にK2F7を用いる組合わせであり、プロコラゲナーゼ濃度約3.1ng/mlまで定量可能であった。この場合の検量線を第1図に示す。

また、既知量のプロコラゲナーゼを、BSAを0.1 w/v%含むPBS(pH7.4)で希釈するかわりにヒト血清(ギブコ社製)で希釈して、上記の方法で測定しても、ヒト血清の存在はプロコラゲナーゼの測定に影響をおよぼさないことが確かめられた。

#### (5) サンドイッチ法による癌患者および健常人の血清中プロコラゲナーゼの定量

固相化モノクローナル抗体にK5E1を用い、ビオチニル化抗プロコラゲナーゼモノクローナル抗体にK2F7を用いてサンドイッチ法により癌患者37人の血清37検体および健常人31人の血清31検体中のプロコラゲナーゼ濃度を測定した。

まず、各血清100  $\mu$ lをそれぞれ固相化抗体〔前記(1)と同様にしてK5E1をマイクロプレートのウェルに固定化した抗体〕に加えて室温で2時間反応させ、T-PBS(pH7.4)で洗浄した。

その後は、検量線の作成の場合と同様にしてビオチニル

化したK2F7、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ（アマーシャム社製）、過酸化水素およびo-フェニレンジアミンを順次反応させ、得られた反応液の492nmにおける吸光度を測定した。

そして、この吸光度をもとに第1図の検量線から反応液中のプロコラゲナーゼ濃度を読み取り、血清中のプロコラゲナーゼ濃度を算出した。

癌患者群および健常人群の血清中プロコラゲナーゼ濃度 (ng/ml) の平均および標準偏差を第4表に示す。

第 4 表

検 体	プロコラゲナーゼ濃度	
	平均 (ng/ml)	標準偏差
癌患者血清 (n=37)	28.99	36.50
健常人血清 (n=31)	9.11	6.67

Cochran-Cox 検定の結果、癌患者血清中のプロコラゲナーゼ濃度は、健常人血清中のそれよりも有意に ( $P < 0.01$ ) 高いことがわかった。そして、カット・オフ値を健常人血清のプロコラゲナーゼ濃度の平均値 (9.11ng/ml) と標準偏差値の3倍との和 (29.12ng/ml) に設定した場合、癌患者での陽性例は、37例中10例 (27%) であり、健常人での陽性例



は認められなかった。

### 実施例 3

#### 本発明のプロコラゲナーゼ定量方法による癌患者のスクリーニング：

臨床的に癌の種類が特定された癌患者60名の血清60検体および健常人4名の血清4検体、合計64検体を、その由来が測定者にわからないようにランダムに並べて、実施例2-(5)に記載した方法と同様にして各血清中のプロコラゲナーゼ濃度を測定し、実施例2-(5)で得られた健常人の値と比較した。

即ち、平均値と標準偏差値の3倍との和(29.12ng/ml)を基準にし、これよりも高値を示した検体については、癌患者由来の血清であると判定した。

また、対照として市販の腫瘍マーカー定量キット、CEA・EIA II「アボット」(ダイナボット社製)およびイムノクロン™CA19-9(富士レビオ社製)を用いてそれぞれ上記各検体中のCEA濃度およびCA19-9濃度を測定し、各添付文書等に従い、それぞれ5ng/mlおよび37U/mlを基準に癌の判定を行った。

その結果、本発明の方法による癌患者での陽性例は60例中20例(33%)であり、健常人での陽性例は認められなかつ

た。また、市販の腫瘍マーカー定量キットで検出できなかった癌の陽性例も認められた。

従って、本発明の方法によって血清中プロコラゲナーゼ濃度 (ng/ml) を定量し、癌患者をスクリーニングすることは、従来の癌診断方法を補完する方法として有用である。

これらの結果を第5表に示す。

第 5 表

臨床診断による判定	本発明による判定	CEAによる判定	CA19-9による判定
食道癌	+	-	+
胃癌	-	-	+
胃癌	+	-	+
胃癌	-	-	-
胃癌	+	+	+
胃癌	-	-	-
胃癌	-	+	-
胃癌	-	-	-
胃癌	-	-	-
胃癌	+	-	-
胃癌	-	+	-
胃癌	-	-	+
胃癌	-	+	-
胃癌	-	-	-
胃癌	-	-	-
胃癌	+	-	-
胃癌	-	+	+
胃癌	-	+	+
胃癌	-	-	+
癌	+	+	+

(次頁に続く)

(第5表の続き)

胃癌	+	-	+
胃癌	-	+	-
大腸癌	-	-	-
大腸癌	-	-	+
大腸癌	+	-	+
大腸癌	-	-	-
大腸癌	+	-	-
大腸癌	-	-	+
肝癌	-	+	+
肝癌	-	-	+
肝癌	+	+	+
胆嚢癌	-	+	+
胆嚢癌	-	+	+
胆管癌	-	-	+
脾癌	+	-	-
肺癌	+	-	-
肺癌	+	+	-
腎癌	-	-	-
腎癌	+	-	-
腎癌	-	-	+
膀胱癌	-	-	-
尿管腫瘍	+	-	-
尿管腫瘍	-	-	-
尿管腫瘍	-	-	-
前立腺癌	-	-	-
前立腺癌	-	-	-
前立腺癌	-	+	-
前立腺癌	-	-	-
乳癌	-	-	+
乳癌	-	-	-
子宮頸癌	-	-	-

(次頁に続く)

(第5表の続き)

子宮頸癌	—	—	—
子宮頸癌	—	—	+
卵巢癌	+	+	+
卵巢癌	—	—	—
卵巢癌	—	—	+
卵巢癌	+	—	+
卵巢癌	+	—	+
外陰癌	+	—	—
骨腫瘍	+	+	+
健常人	—	—	—
健常人	—	—	—
健常人	—	—	—
健常人	—	—	—

注) +印は各診断方法で癌と判定されたことを示し、  
—印は癌でないと判定されたことを示す。

#### 実施例 4

本発明の方法によるRA患者およびOA患者の血清中プロコラ  
ゲナーゼ濃度の定量：

実施例 2-(5)に記載した方法と同様にしてRA患者14人の  
血清14検体およびOA患者7人の血清7検体の各血清中のプロ  
コラゲナーゼ濃度を測定し、実施例 2-(5)で測定した  
健常人の値と比較した。

結果を第6表に示す。

第 6 表

検 体	プロコラゲナーゼ濃度	
	平均 (ng/ml)	標準偏差
RA患者血清 (n=14)	47.81	50.14
OA患者血清 (n= 7)	34.48	16.63
RA+OA 患者血清 (n=21)	43.43	41.75
健常人血清 (n=31)	9.11	6.67

Cochran-Cox 検定の結果、RA患者およびOA患者血清中のプロコラゲナーゼ濃度は、健常人血清中のそれよりも有意に ( $P < 0.05$ ) 高いことがわかった。そして、カット・オフ値を健常人血清のプロコラゲナーゼ濃度の平均値 (9.11ng/ml) と標準偏差値の3倍との和 (29.12ng/ml) に設定した場合、RA患者での陽性例は、14例中 8例 (57%) で、OA患者での陽性例は、7例中 5例 (71%) であり、健常人での陽性例は認められなかった。

#### 産業上の利用可能性

本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、簡便かつ迅速にプロコラゲナーゼを酵素免疫測定によって定量することができる。

また、本発明の定量方法を用いてヒト血清中プロコラゲ

ナーゼ濃度を定量したところ、癌患者、RA患者、OA患者の血清中プロコラゲナーゼ濃度は、いずれにおいても健常者の血清中プロコラゲナーゼ濃度よりも有意に高値を示した。

従って、本発明の定量方法を用いて、ヒト血清中プロコラゲナーゼ濃度の定量を行うことは、コラゲナーゼ活性が亢進する疾患、例えば、癌、RA、OA等の患者の診断を行ううえで有益である。

## 請求の範囲

1. I型、II型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼの分子量52000のプロコラゲナーゼに対するモノクローナル抗体であって、

(a) イムノグロブリンクラスおよびサブクラスG<sub>1</sub>に属し、L鎖アイソタイプがκに属する、

(b) I型、II型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼに対し阻害活性を有する、

ことを特徴とするモノクローナル抗体。

2. I型、II型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼの分子量52000のプロコラゲナーゼに対するモノクローナル抗体であって、

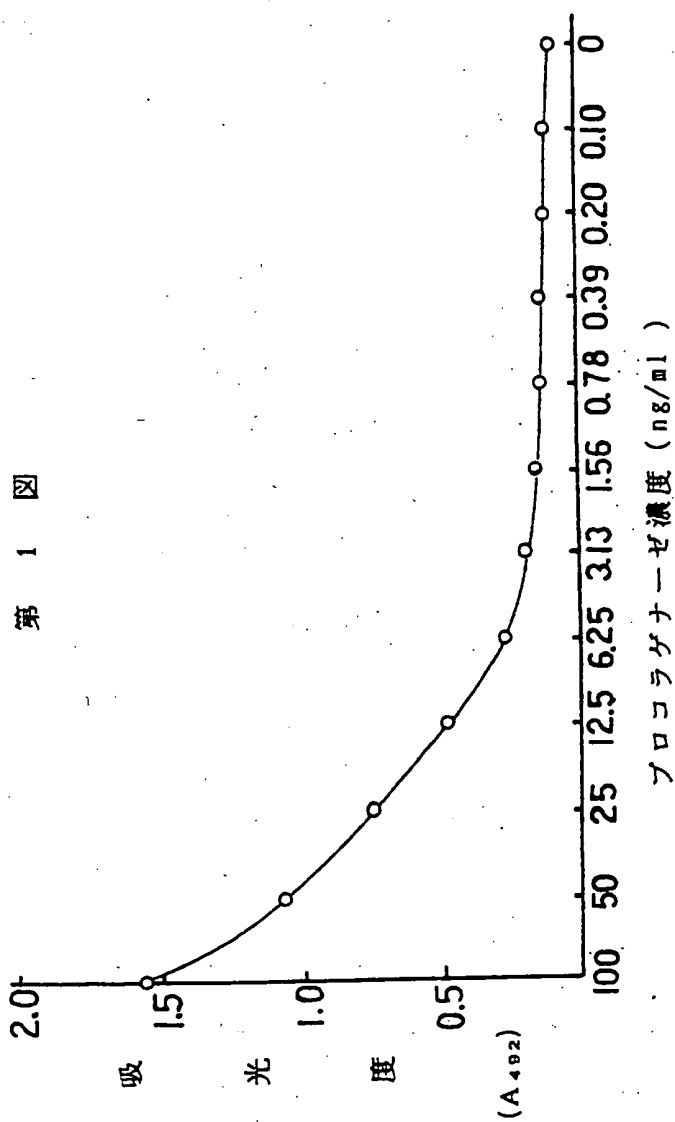
(a) イムノグロブリンクラスおよびサブクラスG<sub>1</sub>に属し、L鎖アイソタイプがκに属する、

(b) I型、II型およびIII型コラーゲンを分解するコラゲナーゼに対し阻害活性を有する、

ことを特徴とするモノクローナル抗体を用いて、酵素免疫測定法によってプロコラゲナーゼを定量する方法。

3. 酵素免疫測定法がサンドイッチ法である請求の範囲第2項記載の定量方法。

1/1





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00144

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C12P21/08, G01N33/577//C12N5/20, 15/06 (C12P21/08, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P21/08, G01N33/577, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Biological ABSTRACTS Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X/Y	Biochemistry, Vol.27, No.18, (1988), Bente Birkedal - Hansen et al. "Monoclonal Antibodies to human fibroblast procollagenase" p.6751-6758	1/2-3
Y	JP, A, 57-208458 (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), December 21, 1982 (21. 12. 82), (Family: none)	2-3
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"d" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
April 30, 1991 (30. 04. 91)	May 20, 1991 (20. 05. 91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 91/ 00144

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl<sup>8</sup></b> <b>C12P21/08, G01N33/577/C12N5/20, 15/06 (C12P21/08, C12B1:91)</b>		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
<b>IPC</b>	<b>C12P21/08, G01N33/577, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08</b>	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
<b>Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)</b>		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
<b>X/Y</b>	<b>Biochemistry, 第27巻, 第18号, (1988), Bente Birkedal - Hansen et al. "Monoclonal Antibodies to human fibroblast procollagenase" p. 6751-6758</b>	<b>1/2-3</b>
<b>Y</b>	<b>JP, A, 57-208458 (三井東圧化学株式会社), 21. 12月. 1982 (21. 12. 82), (ファミリーなし)</b>	<b>2-3</b>
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
<b>30. 04. 91</b>	<b>20.05.91</b>	
国際調査機関	権限のある職員	
<b>日本国特許庁 (ISA/JP)</b>	<b>特許庁審査官</b>	<b>4 B 8 2 1 4</b>
	<b>内 田 俊 生</b>	